



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: 0 479 180 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91116635.3

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/11, C12N 5/10,
A01H 5/00, A61K 31/70,
//C12N15/55, C12N9/22

(22) Anmeldetag: 30.09.91

(30) Priorität: 05.10.90 DE 4031543

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.04.92 Patentblatt 92/15

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE ES FR GB GR IT LI NL

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Eckes, Peter, Dr.
Am Flachsland 18
W-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)
Erfinder: Schneider, Rudolf, Dr.
Feldbergstrasse 98
W-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)

(54) Virusresistente Pflanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung.

(57)

Die Erfindung betrifft Gene zur Herstellung virusresistenter Pflanzen

Das Gen kodiert für eine Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann und die in Folge verknüpft ist mit einer antisense-Sequenz, die in sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglicht sowie mit einer antisense Sequenz, die in sense Orientierung für ein für den Stoffwechsel einer Pflanze destruktives Protein kodiert.

Nachdem ein Virus die Zelle befallen hat, wird die RNA mittels der viralen Replikase oder durch eine Replikasefunktion, die über einen anderen Mechanismus in der Zelle aktiviert wurde, in eine komplementäre RNA umgeschrieben und die nun in sense Orientierung vorliegende Information für ein zelldestruktives Enzym wird abgelesen.

EP 0 479 180 A2

Phytopathogene Viren parasitieren vom Stoffwechsel ihrer Wirtspflanzen und können je nach befallener Spezies und Sorte erhebliche Schäden verursachen. Die Viren gelangen in den allermeisten Fällen über Wunden oder mittels Überträgern in das Pflanzengewebe. Tierische Überträger, die mit Viren infiziert sind, geben beim Einstich ins Pflanzengewebe oder bei der Fraßtätigkeit Viren ab. Die Übertragung eines bestimmten Virustyps durch ein Insekt ist vermutlich hauptsächlich durch das "coat"-Protein des Virus beeinflusst (Chen, B. et al., *Journal of General Virology* 71, 939-944, 1990). Auf welche Weise auch immer Viren in pflanzliches Gewebe gelangen, sie müssen, um sich vermehren zu können, letztlich durch intakte Zellmembranen in die Wirtszellen eindringen. Zellen mit beschädigtem Membransystem sterben in der Regel sehr schnell ab. Wie die Viren die Zellmembranen passieren, ist noch nicht endgültig geklärt. So ist denkbar, daß die Pflanzenzellen selbst in einem Pinozytose ähnlichen Vorgang das Virus aktiv aufnehmen. Andere Überlegungen postulieren die Beteiligung von Rezeptoren auf der Pflanzenoberfläche, die mit Virusproteinen in Wechselwirkung treten. Für diese Auffassung gibt es einige Hinweise, aber noch keine endgültige Lösung. So konnte in einem Versuch gezeigt werden, daß eine Mischung von Tabak Mosaik Virus (TMV) und coat protein desselben Virus auf *Nicotiana tabacum* var. Xanthi (Holoubek, V. *Nature* 203, 499-501, 1964) oder *Chenopodium amaranticolor* (Novikov, V.K. et al., *Virology* 41, 101-107, 1970) weniger Läsionen verursachte als ein Virus alleine. Heterologes Protein von BSMV (Barley Stunt Mosaic Virus) dagegen zeigte keinen Effekt (Novikov, V.K. et al., *Virology* 41, 101-107, 1970).

Die Nukleinsäure besteht bei phytopathogenen Viren meistens aus RNA und nur selten aus DNA. Die Viruspartikel, die im wesentlichen aus Nukleinsäure, umgeben von einer Proteinhülle (Capsid) aus Untereinheiten bestehen, haben verschiedenartige Formen. Am häufigsten findet man stäbchenförmige (elongiert) mit helikaler Symmetrie wie z.B. TMV und isometrische (sphärisch) mit ikosaedrischer Symmetrie z.B. Cucumber Mosaic Virus (CMV) und Geminiviren. Die Viren unterscheiden sich hinsichtlich Form, Nukleinsäuregehalt, Nukleinsäureform (ein- oder zweisträngig), Molekulargewicht der Nukleinsäure sowie hinsichtlich der Wirtspflanzen und der Überträger, die sie auf Wirtspflanzen übertragen.

Ein relativ gut charakterisiertes und in Gemüsepflanzen ökonomisch bedeutendes Virussystem ist das Gurkenmosaikvirus (CMV; Cucumber Mosaic Virus). Das Virus besteht aus 3 funktionellen Stücken einzelsträngiger RNA, die in 3 verschiedene ikosaedrische Partikel mit 28 nm Durchmesser verpackt werden, und zu gleichen Raten sedimentieren (tripartite Virus) (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 213 (No. 1 revised), July 1979). Das Virus verursacht neben anderen Symptomen Mosaikbildung, z.B. auf Gurken und anderen Cucurbitaceen, sowie Nekrosen und Fäulnisbildung, z.B. auf Spinat und Tomaten. Der Wirtsbereich ist ungewöhnlich groß. So werden Nutz- und Zierpflanzen, auch Bäume und Büsche aus über 40 Familien befallen (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 213 (No. 1 revised), July 1979).

Es gibt verschiedene Ansätze, virusresistente Pflanzen zu erhalten. Durch Expression von coat protein verschiedener Viren gelang es, Symptome des jeweiligen Virus auf der Pflanze abzuschwächen und die Virusvermehrung zu behindern. Ausgegangen war dieser Ansatz von der Beobachtung, daß eine Virusinfektion sehr viel schwächer ist, wenn die Pflanze mit einem verwandten Virus vorher infiziert wurde (Hamilton, R.I. in *Plant Disease V* (Horsfall, J.G. and Cowling, F.B., eds), pp. 279-303, Academic Press (1980)). Mit TMV gelang es, in einem in vitro System zu zeigen, daß die Freisetzung von RNA aus TMV-Teilchen und die anschließende Translation behindert wird, wenn einem Extrakt coat protein zugesetzt wird (Wilson, T.M.A. et al., *Virology* 145, 346-349, 1985). Die Überexpression von TMV coat protein in transgenem Tabak führte gleichfalls zu einer starken Abschwächung der TMV Infektion (Powell-Abel, P. et al., *Science* 232, 738-743, 1986). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei einer Überexpression der coat protein Gene von Alfalfa Mosaik Virus (Tumer, N.E. et al., *EMBO J.* 6, 1181-1188, 1987; Loesch-Fries, L.S. et al., *EMBO J.* 6, 1845-1851, 1987), Kartoffel Virus X (Hemenway, C. et al., *EMBO J.* 7, 1273-1280, 1988).

Eine weitere Möglichkeit resistente Pflanzen zu erhalten, beinhaltet die Transkription von antisense RNA gegen das Pflanzenvirusgenom. Zugrundegelegt wird dabei die Annahme, daß die exprimierte antisense RNA mit der viralen RNA ein "Annealing" vollzieht und dadurch die Expression der Virus-RNA behindert. Es konnte für Kartoffel Virus X und Cucumber Mosaic Virus gezeigt werden, daß ein Schutz der Pflanzen gegen Virusinfektion besteht, wenn antisense RNA exprimiert wird, allerdings mit der Einschränkung, daß die verwendeten Viruskonzentration beim Testen sehr niedrig sein müssen (Hemenway, C. et al., *EMBO J.* 7, 1273-1280, 1988; Cuozzo, M. et al., *Bio/Technology* 6, 549-558, 1988). Für Tobacco Rattle Virus gelang es nicht, durch antisense Expression eine Virusresistenz in transgenen Pflanzen zu erzeugen (Baulcombe et al. in *Plant Resistance to Viruses* (CIBA Foundation Symposium 133) (Evered, D. and Harnett, S., eds), pp. 170-184, John Wiley (1987)).

Für einige Virussysteme sind Satelliten-RNA Moleküle beschrieben, die eine Abschwächung der Virussymptome bewirken. Satelliten RNA Moleküle sind in der Regel klein (300-500 Basen) und hängen bei der Vermehrung vollständig von einem Helfer Virus ab (Francki, R.I.B., *Ann u. Rev. Microbiol.* 39, 151-174, 1985). Die Satelliten RNAs sind nicht immer in einer viralen Kultur anwesend. Mit der DNA einer CMV

Satelliten RNA in Agrobakterien gelang es transgene Pflanzen zu konstruieren, die Satelliten RNA exprimierten (Baulcombe, D.C. et al., Nature 321, 446-449, 1986; Harrison, B.D. et al., Nature 328, 799-802, 1987). Die transgenen Pflanzen zeigen eine verminderte Virusproduktion und Abschwächung der Symptome im Test mit CMV-Partikeln (Harrison, B.D. et al., Nature 328, 799-802, 1987).

- 5 Eine weitere Alternative zur Erzeugung von Virusresistenz in Pflanzen, die von der Züchtung schon immer praktiziert wurde, ist die Auswahl einer pflanzenkodierten Virusresistenz und Übertragung auf interessante Sorten. Die Molekularbiologie eröffnet hierbei die Möglichkeit, Gene von Spezies zu Spezies zu transferieren und Bereiche zu erschließen, die vorher nicht zugänglich waren.

- Es wurde nun ein neuer Ansatz zur Erzeugung virusresistenter Pflanzen gefunden. Ausgegangen wird
10 dabei von einer RNA-Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann. In Frage kommen dafür alle Sequenzen, die es einer Replikase erlauben eine komplementäre RNA-Synthese zu initiieren. Die ursprüngliche Virussequenz sollte so modifiziert werden, daß in der umgeschriebenen, komplementären RNA kein 5'-AUG-3' auftritt. Es wird so sichergestellt, daß das AUG der im umgeschriebenen Strang in sense vorliegenden Funktion als erstes Startcodon erkannt wird. Sollte keine
15 entsprechende Basensequenz in der ursprünglichen RNA vorhanden sein, dann kann diese auch unverändert verwendet werden. Das gleiche gilt für den Fall, daß sich ein vorhandenes AUG im umgeschriebenen Strang als nicht störend für die Translation der gewünschten Funktion erweist. Bevorzugt wird aber die modifizierte Virussequenz verwendet.

- An das 5'-Ende dieser Sequenz ist eine antisense-Sequenz gekoppelt, die in sense Orientierung eine
20 cap unabhängige Translation ermöglicht. Anschließend folgt die antisense Sequenz eines für den Stoffwechsel der Pflanze destruktiven Gens. Das konstruierte Gen kann mit der Sequenz für das destruktive Gen enden, oder das 5'-Ende besteht aus dem nicht kodierenden 5'-Ende eines RNA Virus, es kann aber auch andere Sequenzen mit Funktionalität enthalten.

- Das obengenannte 3'-Ende einer RNA zur Initiation der komplementären RNA kann auch mit einem
25 beliebigen Gen in sense Orientierung verbunden sein. Wenn ein Virus RNA 5'-Ende oder eine interne Virus-RNA-Sequenz mit derselben Funktion, nämlich Initiationsstart zum Umschreiben in komplementäre RNA, bekannt wäre, könnte dieses mit den entsprechenden Modifizierungen in den einzufügenden Gensequenzen, dieselbe Rolle wie das beschriebene 3'-Ende spielen.

- Eine so beschriebene RNA wird durch ein passendes DNA Stück im Pflanzengenom von der Pflanze
30 konstitutiv oder auch induziert exprimiert und hat in der nicht infizierten Pflanze keine Funktion. Wenn ein Viruspartikel die Zelle befällt, wird durch das mitgebrachte Replikase-Enzym die RNA in komplementäre RNA umgeschrieben, die nun wiederum die Translation eines zellzerstörenden Enzyms ermöglicht. Bei geeigneter Wahl der Funktion wird die Zelle zerstört und das Virus an der weiteren Ausbreitung gehindert. Nicht infizierte Pflanzenzellen zeigen diese Reaktion nicht.

- 35 Die Erfindung betrifft somit

1. Ein Gen kodierend auf RNA-Ebene für eine Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann und die in Folge gekoppelt ist an eine antisense-Sequenz, die in
40 sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglicht, sowie mit einer antisense RNA Sequenz, die in sense Orientierung für ein für den Stoffwechsel einer Pflanze destruktives Protein kodiert.

- Dieses Gen muß eine RNA exprimieren, die durch eine Replikasfunktion aus einem Viruspartikel freigesetzt, durch ein Virus erzeugt oder über einen anderen Mechanismus in der Zelle aktiviert, in die komplementäre Sequenz umgeschrieben werden kann.

- Gleichzeitig muß aus der umgeschriebenen, komplementären Form nach der Translation die beabsichtigte
45 Funktion erzeugt werden können.

2. Wirtszellen, die das unter 1. charakterisierte Gen enthalten.

3. Die Verwendung der durch das unter 1. charakterisierte Gen kodierten RNA als Vorstufe zu einem antiviralen Agens.

- Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche bestimmt.
50

- Zur Synthese des erfindungsgemäßen Gens werden zuerst die genannten Teilstücke bereitgestellt, die dann über Linker miteinander verknüpft werden.

- Die Synthese des ersten DNA-Teilstücks erfolgt vorteilhaft auf Basis der 3'-Sequenz eines RNA-Virus. Bevorzugt wird RNA aus pflanzenpathogenen Viren verwendet, insbesondere aus Cucumber-Mosaic-Virus,
55 Brom-Mosaic-Virus, Tabak-Mosaik-Virus, Alfalfa Mosaic Virus sowie aus Cowpea Mosaic Virus.

- Für die verwendete 3'-Sequenz ist wesentliche Voraussetzung, daß sie als Initiationssequenz zur Synthese einer (-)RNA dienen kann oder im Falle von (-)RNA Viren zur Synthese des (+)RNA Stranges, also jeweils für die komplementäre RNA-Sequenz.

Die ursprüngliche Virussequenz wird an allen 5'-CAU-3'-Stellen der zu exprimierenden RNA so verändert, daß in der umgeschriebenen Form des Moleküls keine 5'-AUG-3'-Sequenzen auftreten. Die Sequenz muß so geändert werden, daß die Funktion des 3'-Endes als Replikase Promotor erhalten bleibt. Die Änderung der Sequenz wird vorgenommen durch Einführung einer Punktmutation an einer oder mehreren Stellen.

Wenn sichergestellt ist, daß das 3'-Ende der (-)RNA eines (+)RNA Virus oder entsprechend das 3'-Ende der (+)RNA eines (-)RNA Virus als Initiationsort der Replikase erkannt wird und zum Umschreiben des RNA-Moleküls führt, kann auch mit der 3'-Sequenz der (-)RNA des (+)RNA Virus oder der 3'-Sequenz der (+)RNA des (-)Virus gearbeitet werden, wobei auch hier am vorteilhaftesten die Sequenz so modifiziert werden muß, daß in der umgeschriebenen RNA vor dem Startcodon der zu exprimierenden Funktion kein AUG mehr auftritt.

Vorteilhaft wird das DNA-Teilstück mit Hilfe der RNA des Cucumber- bzw. Brom-Mosaic-Virus synthetisiert, insbesondere ausgehend von den letzten 200 bis 400 Nukleotiden, bevorzugt den letzten 280-320 Nukleotiden des 3'-Endes.

Die von Gould, A.R. in Eur. J. Biochem. 126, 217-226 (1982) publizierte RNA Sequenz des Cucumber Mosaic Virus wird mit gutem Erfolg als Vorlage zur DNA Synthese verwendet.

Das zweite DNA-Teilstück wird vorteilhaft ausgehend von der cap independent translation sequence RNA des Tomato Etch Virus synthetisiert (Carrington, J.C. et al., J. Vir. 64 1590-1597, 1990). Die ersten 150-200 Nukleotide des 5'-Endes werden bevorzugt hierfür eingesetzt.

Es können auch alle anderen RNA-Sequenzen aus anderen Viren verwendet werden, sofern sie in der sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglichen. Insbesondere bevorzugt wird die von Allison, R. Virology 154, 9-20, (1986) veröffentlichte RNA Sequenz als Basis zur DNA Synthese eingesetzt. Die DNA wird so synthetisiert, daß sie auf RNA-Ebene für die antisense RNA der "cap independent translation sequence" kodiert.

Das dritte Teilstück besteht aus dem Gen, das für ein zelldestruktives Enzym kodiert, bevorzugt für Proteasen, DNasen, RNasen, Replikasen, Lipasen sowie Enzymen, die die Membrankonformation störend beeinflussen. Bevorzugt werden Gene verwendet, die für RNasen kodieren. Vorteilhaft wird die von Ikehara, M. in Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4695 (1986) publizierte DNA-Sequenz eingesetzt. Auch hier erfolgt die Synthese derart, daß die DNA auf RNA-Ebene für die antisense Sequenz kodiert.

Nach Ligation der Teilstücke wird das Gen transkribiert, ist aber nicht funktionell. Das Gen wird erst durch eine hinzukommende Replikase (des Virus) durch Umschreiben in die komplementäre RNA aktiviert, wobei die antisense in sense RNA umgeformt wird. Die Replikase kann durch eine analoge Funktion ersetzt werden.

Ferner kann RNA kodierend für das 5'-Ende einer Virus RNA angehängt werden, das in seiner (-) Form die Funktionalität des oben beschriebenen 3'-Endes besitzt. Diese 5'RNA Sequenz kann aus den obengenannten Quellen isoliert werden.

Die gegebene Information für das 3'-RNA-Ende gilt also entsprechend für das 5'-RNA-Ende.

Die zusammengesetzten Oligonukleotide werden mit Hilfe der Vektoren pUC19, pUC18 oder pBluescript (Stratagene, Heidelberg, Product Information) kloniert und sequenziert.

Das bestätigte Oligonukleotid wird in einen intermediären Plasmidvektor zwischen einen in Pflanzen wirksamen Promotor und Terminator kloniert. Bevorzugt wird der Vektor pDH51 (Pietrzak, M. et al., NAR 14, 5857, (1986)) mit einem 35S-Promotor und Terminator verwendet.

Als Terminator kann ebenfalls jede Sequenz gewählt werden, die ein 3'-Ende erzeugt, das als Substrat für die Replikase eingesetzt werden kann und zu einer funktionellen, komplementären RNA führt. Möglich wäre es z.B. den Terminator eines Polymerase I- oder Polymerase III-Gens zu verwenden. Ein anderer denkbarer Ansatz ist die Verwendung einer Ribozymsubstratstelle als unmittelbares Ende der Virussequenz, auf die eine Ribozymfunktion folgen müßte, mit der vorangehenden Sequenz als Substrat.

Nach anschließender Transformation von E. coli, wie z.B. E. coli MG 1061, DH1, DK1 oder XL-1, werden positive Klone nach an sich bekannten Methoden (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982), wie Plasmidminipräparation und Spaltung mit einem entsprechenden Restriktionsenzym, identifiziert.

Die so erhaltenen Vektoren werden verwendet, um Pflanzen zu transformieren. Dies kann durch Techniken wie Elektroporation oder Mikroinjektion erfolgen.

Das DNA-Fragment bestehend aus Promotor, Oligonucleotid und Terminator wird ebenfalls in Pflanzenvektoren subkloniert.

Als Pflanzenvektoren können z.B. pGV3850 (Zambryski, P. et al, EMBO J. 2, 2143-2150 (1983)) oder pOCA18 (Olszewski, N., NAR 16, 10765-10782, (1988)) eingesetzt werden. Vorteilhaft wird mit pOCA18 gearbeitet.

Bevorzugt wird die Kokultivierung von Protoplasten oder die Transformation von Blattstückchen mit Agrobakterien angewandt. Dazu wird das Pflanzenvektorkonstrukt durch Transformation mit g. reiner DNA oder, vermittelt über einen Helferstamm wie *E. coli* SM10 (Simon R. et al., *Biotechnology* 1, 784-791 (1983)) in *Agrobacterium tumefaciens* wie A281 oder C58 mit einem Ti Plasmid über ein "triparental mating" transferiert. Direkte Transformation und "triparental mating" wurden, wie in "Plant Molecular Biology Manual" (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)) beschrieben, durchgeführt.

Es können grundsätzlich alle Pflanzen mit den die erfindungsgemäß konstruierte DNA tragenden binären Pflanzenvektoren transformiert werden. Bevorzugt sind dikotyledone Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen, die Stärke, andere Kohlenhydrate, Eiweiße oder Fette in nutzbaren Mengen in ihren Organen produzieren oder speichern oder die Obst und Gemüse produzieren oder die Gewürze, Fasern und technisch verwertbare Produkte oder Arzneimittel, Farbstoffe oder Wachse liefern und ebenfalls Futterpflanzen. Als Beispiel sollen Tomate, Erdbeere, Avocado, sowie Pflanzen, die tropische Früchte tragen, z.B. Papaya, Mango, aber auch Birne, Apfel, Nektarine, Aprikose oder Pfirsich genannt werden. Ferner sollen als zu transformierende Pflanzen beispielhaft alle Getreidearten, Raps, Rüben, Kartoffeln, Sojabohne, Baumwolle, Mais, Zuckerrübe oder Sonnenblume angeführt werden. Die transformierten Zellen werden mit Hilfe eines Selektionsmediums selektiert, zu einem Kallus herangezüchtet und auf einem entsprechenden Medium zur Pflanze regeneriert (Shain et al., *Theor. appl. Genet.* 72, 770-770 (1986); Masson, J. et al., *Plant Science* 53, 167-176 (1987); Zhan et al., *Plant Mol. Biol.* 11, 551-559 (1988); McGranham et al., *Bio/Technology* 6, 800-804 (1988) Novrate et al., *Bio/Technology* 7, 154-159 (1989).

Das beschriebene Wirkprinzip kann prinzipiell auch gegen andere pathogene Organismen eingesetzt werden, wenn dafür gesorgt wird, daß die virale Replikase von einem geeigneten Promotor im Pflanzengenom induziert werden kann.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiele

1. DNA-Sequenzen zur Expression einer "Suizid"-RNA

A) 3'-Ende CMV nach Eur. J. Biochem. 126, 217-226, 1982 mit PstI und SphI Enden

30

```

      10      20      30      40
5'  CTGCAGTCCA TCCAGCTTAC GGCTAAAATG GTCAGTCGTG
3'  GACGTCAGGT AGGTCGAATG CCGATTTTAC CAGTCAGCAC
      50      60      70      80
35  TCTTTCACAC GCCGATGTCT TACAAGATGT CGAGGTACCC
    AGAAAGTGTG CGGCTACAGA ATGTTCTACA GCTCCATGGG
      90     100     110     120
40  TTGAAATCAC CTCCTAGATT TCTTCGGAAG GGCTTCGTGA
    AACTTTAGTG GAGGATCTAA AGAAGCCTTC CCGAAGCACT
      130     140     150     160
    GAAGCTCGTG CACGGTAATA CACTGATATT ACCAAGAGTG
    CTTGAGCAC  GTGCCATTAT GTGACTATAA TGTTCTCAC
      170     180     190     200
45  CGGSTATCGC CTGTGGTTTT CCACAGGTTT TCCATAAGGA
    GCCCATAGCG GACACCAAAA GGTGTCCAAG AGGTATTCTT
      210
    GACCAGCATG C 3'
    CTGGTCGTAC G 5'

```

50

B) 3'-Ende CMV nach Eur. J. Biochem. 126, 217-226, 1982 mit PstI und SphI Enden und Punktmutationen der 5'-CAT-3' Triplets wie beschrieben 3'-GTA-5'

55

10 20 30 40
 5' CTGCAGTCCA ACCAGCTTAC GGCTAAAATG GTCAGTCGTG
 3' GACGTCAAGT TGGTCGAATG CCGATTTTAC CAGTCAGCAC
 5 50 60 70 80
 TCTTTCACAC GCCGATGTCT TACAAGATGT CGAGGTACCC
 AGAAAGTGTG CGGCTACAGA ATGTTCTACA GCTCCATGGG
 90 100 110 120
 TTGAAATCAC CTCCTAGATT TCTTCGGAAG GGCTTCGTGA
 10 AACTTTAGTG GAGGATCTAA AGAAGCCTTC CCGAAGCACT
 130 140 150 160
 GAAGCTCGTG CACGGTAATA CACTGATATT ACCAAGAGTG
 CTTGAGCAC GTGCCATTAT GTGACTATAA TGTTTCTCAC
 170 180 190 200
 15 CGGGTATCGC CTGTGTTTTT CCACAGGTTT TCCAAAAGGA
 GCCCATAGCG GACACCAAAA GGTGTCCAAG AGGTTTTCTT
 210
 GACCAGCATG C 3'
 CTGCTCGTAC G 5'

C) 3'-Ende CMV Y mit PstI und SphI Enden nach Hayakama T. et al. Gene 71, 107-114, 1988

25 10 20 30 40
 5' CTGCAGCGGG TTGTCCATCC AGCTTACGGC TAAAATGGTC
 3' GACGTGCCCC AACAGGTAGG TCGAATGCCG ATTTTACCAG
 50 60 70 80
 AGTCGTGGAG AAATCTACGC CAGCAGATTT ACAAATCTCT
 30 TCAGCACCTC TTTAGATGCG GTCGTCTAAA TGTTTAGAGA
 90 100 110 120
 GAGGCGCCTT TGAAACCATC TCCTAGGTTT CTTCGGAAGG
 CTCCGCGGAA ACTTTGCTAG AGGATCCAAA GAAGCCTTCC
 130 140 150 160
 ACTTCGGTCC GTGTACCTCT AGCACAACGT GCTAGTTTCA
 35 TGAAGCCAGG CACATGGAGA TCGTGTGCA CGATCAAAGT
 170 180 190 200
 GGGTACGGGT GCGGGGGGGT GAGGACCCCC GGAGGTTTTT
 CCCATGCCCA CGGGGGGGTG
 40 210
 GAGACCAGCA TGC 3'
 CTCTGGTCGT ACG 5'

45 D) 3'-Ende CMY mit PstI und SphI Enden und Punktmutation der 5'-CAT-3' Triplets wie beschrieben 3'-GTA-5'

50

55

10 20 30 40
 5' TGCAGCGGGT TGTCCAACCA GCTTACGGCT AAAATGGTCA
 3' ACGTCGCCCC ACAGGTTGGT CGAATGCCGA TTTTACCACT
 50 60 70 80
 5 GTCGTGGAGA AATCTACGCC AGCAGATTTA CAAATCTCTG
 CAGCACCTCT TTAGATGCGG TCGTCTAAAT GTTTAGAGAC
 90 100 110 120
 10 AGGCGCCTTT GAAACCAACT CCTAGGTTTC TTCGGAAGGA
 TCCGCGGAAA CTTTGGTTGA GGATCCAAAG AAGCCTTCCT
 130 140 150 160
 CTTCGGTCCG TGTACCTCTA GCACAACGTG CTAGTTTCAG
 GAAGCCAGGC ACATGGAGAT CGTGTTCAC GATCAAAGTC
 170 180 190 200
 15 GGTACGGGTG CCCCCCACC TTCGTGGGGC CTCCAAAAGG
 CCATGCCAC GGGGGGGTGG AAGCACCCTG GAGGTTTTC
 210
 AGACCAGCAT GC 3'
 TCTGGTCGTA CG 5'

E) Nukleotidsequenz für ein RNase T1-Gen aus Proc. Natl. Acad. Sci 83, 4695-4699, 1986 mit Nco I und KpnI-Übergängen der Enden

25 10 20 30 40
 5' CCATGGATCT TCATGGCTTG GACTACACC TGCGGCAGCA
 3' GGTACCTAGA AGTACCGAAC GCTGATGTGG ACGCCGTCGT
 50 60 70 80
 30 ACTGCTACTC TAGCTCTGAC GTTCTACCG CTCAGGCTGC
 TGACGATGAG ATCGAGACTG CAAAGATGGC GAGTCCGACG
 90 100 110 120
 TGGCTACCAG CTGCACGAGG ACGGCGAAAC CGTTGGCTCT
 ACCGATGGTC GACGTGCTCC TGCCGCTTTG GCAACCGAGA
 130 140 150 160
 35 AACTCTTACC CGCACAAATA CAACAACAT GAGGGCTTCG
 TTGAGAATGG GCGTGTATAT GTTGTGATA CTCCCGAAGC
 170 180 190 200
 ACTTTAGCGT TTCTTCTCCG TACTACGAAT GGCCGATCCT
 40 TGAAATCGCA AAGAAGAGGC ATGATGCTTA CCGGCTAGGA
 210 220 230 240
 GTCTAGCGGC GACGTTTACT CCGGTGGTAG CCCAGGTGCT
 CAGATCGCCG CTGCAAATGA GGCCACCATC GGGTCCACGA
 250 260 270 280
 45 GACCGTGTAG TATTCAACGA AAACAACCAG CTCGCTGGCG
 CTGGCACATC ATAAGTTGCT TTTGTTGGTC GAGCGACCGC
 290 300 310 320
 TTATCACCCA CACCGGCGCT TCTGGCAACA ACTTTGTAGA
 AATAGTGGGT GTGGCCGCGA AGACCGTTGT TGAAACATCT
 330
 50 ATGCACCTAA TAGGGTACC 3'
 TACGTGGATT ATCCCATGG 5'

55 F) 5'-Ende CMV RNA3 nach Eur. J. Biochem. 126, 217-226, 1982 mit Eco RI/Bam HI und KpnI-Übergängen

```

      10      20      30      40
5' GAATTCGGAT CCGTAATCTT ACCACTTTCT TTCACGTCGT
3' CTTAAGCCTA GGCATTAGAA TGGTGAAAGA AAGTGCAGCA
      50      60      70      80
GTCGCGTCAG TGACGCTGTG TGTGTGTGTG TGTTAGTTAG
CAGCGCAGTC ACTGCGACAC ACACACACAC ACAATCAATC
      90     100     110
TGTGTCTGTG TTAGATTACG AAGGTTGGTA CC 3'
10 ACACAGCACA AATCTAATGC TTCCAACCAT GG 5'

```

G) Cap independent translation Sequenz nach Virology 154, 9-20, 1986 mit NcoI und PstI-Übergängen

```

15      10      20      30      40
5' CTGCAGTAAA TAACAAATCT CAACACAACA TATACAAAAC
3' GACGTCATTT ATTGTTTAGA GTTGTGTTGT ATATGTTTTG
      50      60      70      80
AAACGAATCT CAAGCAATCA AGCATTCTAC TTCTATTGCA
20 TTTGCTTAGA GTTCGTTAGT TCGTAAGATG AAGATAACGT
      90     100     110     120
GCAATTTTAAA TCATTGCTTT TAAAGCAAAA GCAATTTTCT
CGTTAAATTT AGTAAAGAAA ATTTGTTTTT CGTTAAAGA
      130     140     150
25 GAAAATTTTC ACCATTTACG AACGATAGCC ATGG 3'
CTTTTAAAAG TGGTAAATGC TTGCTATCGG TACC 5'

```

30 2. Synthese der DNA zur Expression von RNA

Die Sequenzen für das beschriebene 3'-Ende des CMV-Virus für die "cap independent translation"-Struktur des TEV und das 5'-Ende werden mit einem DNA-Synthesizer (PCR-Mate 391, Fa. Applied Biosystems) hergestellt. Auch die verwendete RNase wird synthetisch hergestellt.

35

3. Klonierung und Sequenzierung

3a. Klonierung der CMV 3'- und 5'-Sequenzen in pUC 19

40 Die CMV Sequenzen wurden wie beschrieben mit einem PstI bzw. SphI-Linker versehen. Vorzugsweise arbeitete man mit der mutierten CMV Y Sequenz, in der die potentiellen AUG-Triplets im (-)Strang durch Punktmutationen in andere Sequenzen umgewandelt wurden. Die am Synthesizer fertiggestellten Fragmente wurden ligiert und in die PstI/SphI-Stellen von pUC 19 eingebaut.

Die Sequenzierung ergab in jedem Fall die gewünschte Sequenz. Den Polylinker aus diesem Vektor
45 ersetzte man anschließend von PstI bis Eco RI durch einen synthetischen Polylinker mit folgender Sequenz.

```

50 5' -GAATTC GGTACC GAGCTC CCATGG TCTAGA CCCGGG CTGCAG-3'
3' -CTTAAG CCATGG CTCGAG GGTACC AGATCT GGGCCC GACGTC-5
EcoRI KpnI SacI NcoI XbaI SmaI PstI

```

In den so umgebauten Vektor fügte man das synthetisierte Virus-5'-Ende mit einem anhängenden
55 EcoRI/BamHI und Kpn-Linker ein. Die Sequenzierung ergab keine Fehler.

3b. Einbau des RNase-Gens und der "cap independent Translation" Sequenz

Das RNase-Gen wurde so synthetisiert, daß am 5'-Ende des ORF eine NcoI-Stelle und am 3'-Ende eine KpnI-Stelle gelegen war. Nach Einbau des RNase-Gens in die NcoI/KpnI-Stellen im Polylinker des Vektors mit den 3'- und 5'-Virussequenzen wurden positiv Klonen durch DNA-Minipräparationen und Restriktionsverdau identifiziert. Die Insertion der "cap independent translation" Sequenz über die PstI und NcoI-Stellen ergänzte diesen Vektor.

4. Klonierung in pDH51

Das fertig zusammengebaute Fragment in pUC19 hatte eine Länge von etwa 1 kb. Es wurde nach Verdau der gereinigten DNA mit Bam HI und SphI aus einem Agarosegel isoliert und in einem Bam HI und SphI geschnittenen pDH51 Vektor eingebaut. Der Terminatoranteil von pDH51 kann nach SphI und SacI Verdau als 0,2 kb Fragment vom Restvektor abgetrennt werden und mit Hilfe von SphI und SacI-Linkern durch einen anderen Terminator ersetzt werden. In Frage kommt dafür z.B. die im EMBO J. 6, 35-41, 1987 beschriebene Sequenz:

5' - TTTTCTTTTT - 3'
3' - AAAACAAAAA - 5'

aus Tabak

5. Klonierung von poCA18

Zur Expression in Pflanzen wird das zusammengebaute Gen mit dem 35 S Promotor aus pDH51 und dem angehängten Terminator in das Pflanzengenom integriert. Dazu ist eine Zwischenklonierung in den binären Pflanzenvektor pOCA 18 nötig. Das Plasmid poCA18 ist in der Veröffentlichung Olszewski, N. et al. NAR 16, 10765-10782, 1988 nacharbeitbar beschrieben. Promotor, Gen und Terminator können aus dem pDH51 Vektor eindeutig mit Hilfe von Eco RI als 1,6 kb Fragment isoliert werden. Dieses Eco RI Fragment (neben dem Vektoranteil von 2,7 kb das einzige Eco RI Fragment) wird in die singuläre Eco RI Schnittstelle von pOCA 18 eingebaut.

6. Transformation von Agrobakterien.

Der poCA18 Vektor mit dem gewünschten Insert wurde in den Agrobakterienstamm A28 (ATCC37349, USA) überführt. Dies geschieht durch ein "Triparental mating" mit Hilfe des E. coli Stammes SM10 (Simon, R. et al., Bio/Technology 1, 784-791, 1983). Gleiche Mengen der Bakterien werden dazu über Nacht auf einen Filter gegeben, mit 2 ml 10 mM MgSO₄ abgespült und in 100 µl Mengen auf YEB-Medium (1 % Yeast Extract, 1 % Pepton, 0,5 % NaCl) mit Tetrazyklin und Rifampicin gegeben. Positive Agrobakterien können durch Hybridisierung nachgewiesen werden.

7. Transformation von Tabak

Die Agrobakterien werden in YEB-Medium mit Rifampicin und Tetrazyclin angezüchtet. 20 ml der Bakterien werden abzentrifugiert, einmal in YEB Medium gewaschen und in 20 ml 10 mM MgSO₄ suspendiert in eine Petrischale gegeben. Als Pflanzenmaterial wird Nicotiana tabacum Wisconsin 38 verwendet. Die Pflanzen werden vorher 4 Wochen unter sterilen Bedingungen auf 2 MS Medium (Murashige, T. et al. Physiol. Plant 15, 473-497, 1962) bei 25°C mit 16 Std. Licht pro Tag kultiviert. Von diesen Pflanzen werden ungefähr 1 cm² große Blattstückchen abgeschnitten, mit sterilem Schmirgelpapier verwundet und 30 sec in die Bakterienkultur eingetaucht.

Die Blattstückchen werden 2 Tage bei 25°C auf 2 MS Medium mit 0,8 % Agar gehalten und anschließend mit flüssigem 2 MS Medium mit 500 mg/l Claforan gewaschen. Danach kommen die Blattstückchen auf MSC 10 Platten. Nach 5-6 Wochen können regenerierte Pflanzen in größere Gefäße umgepflanzt werden, wo sie nach 2-3 Wochen Wurzeln bilden.

2 MS-Medium: MS-Medium mit 2 % Sucrose
MSC 10-Medium: 2 MS-Medium mit 0,1 mg/l NaA 1 mg/l BAP, 100 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Claforan

8. Nachweis der Transformation

- Aus etwa 8 Wochen alten transformierten Tabakpflanzen wird DNA isoliert, mit EcoRI gespalten und auf Nitrozellulosemembranen transfriert. Die Membran wird mit ³²P-markiertem Fragment hybridisiert. Der gewünschte Einbau des Fragments in das Pflanzengenom ist dann erfolgt, wenn nach Exposition eines Röntgenfilmes das eingebaute EcoRI Fragment nachgewiesen werden kann.

9. Nachweis der Expression der RNA

- Aus transgenen Tabakpflanzen wird RNA isoliert, auf einem Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgt mit radioaktiv markiertem Fragment.

10. Infektion mit Virus

- Zum Test der Resistenz der transgenen Pflanzen wird CMV-Virus Stamm Q oder Y verwendet. Transgene Tabakpflanzen werden mit einer Virussuspension aus 10 Tage vorher infizierten Tabak- oder Gurkenpflanzen mit Hilfe von Carborundum infiziert. Transgene Pflanzen sind resistent gegen das Virus.

Patentansprüche

1. Gen kodierend auf RNA-Ebene für eine Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann und die in Folge verknüpft ist mit einer antisense-Sequenz, die in sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglicht sowie mit einer antisense Sequenz, die in sense Orientierung für ein für den Stoffwechsel einer Pflanze destruktives Protein kodiert.
2. Gen nach Anspruch 1 kodierend für eine Initiationssequenz des 3'-Endes einer Virus (+)RNA oder des 3'-Endes einer Virus (-)RNA.
3. Gen nach Anspruch 1 kodierend für eine interne Initiationsstelle einer Replikase einer Virus (+)RNA oder einer Virus (-)RNA.
4. RNA kodiert durch ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Wirtszelle enthaltend ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Wirtszelle enthaltend eine RNA nach Anspruch 4.
7. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen, enthaltend das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
8. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen enthaltend die RNA nach Anspruch 4.
9. Verwendung der durch das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodierten RNA als Vorstufe zu einem antiviralen Agens.
10. Verwendung der durch das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodierten RNA als antivirales Agens nach Inkubation mit Replikase.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : ES

1. Verfahren zur Herstellung eines Gens kodierend für eine RNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) die Synthese des ersten DNA-Teilstücks auf der Basis derjenigen Sequenz eines RNA-Virus erfolgt, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann,
 - b) die Synthese des zweiten DNA-Teilstücks auf der Basis einer viralen RNA erfolgt, die eine cap unabhängige Translation ermöglicht,
 - c) die Synthese des dritten Teilstücks auf der Basis eines Gens erfolgt, das für ein zelldestruktives Gen kodiert wobei die DNA auf RNA-Ebene für die antisense Sequenz kodiert und die synthetisierten Oligonucleotide über Spacer miteinander verknüpft werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen noch ein weiteres funktionelles Teilstück enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Initiationssequenz zur Synthese der Komplementären RNA so modifiziert wird, daß keine 5'-AUG-3'-Sequenzen auftreten.
4. Verfahren zur Transformation einer Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß das nach einem der Ansprüche 1 bis 3 erhältliche Gen mittels eines Vektors direkt oder indirekt über einen Helferstamm in die Wirtszelle gelangt.
5. Verwendung der RNA, die durch ein Gen kodiert wird, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert wird als Vorstufe zu einem antiviralen Agens.
6. Verwendung der RNA, die durch ein Gen kodiert wird, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert wird, nach der Inkubation mit einer Replikase als antivirales Agens.
7. Verfahren zur Herstellung virusresistenter Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen mit einem Gen erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 3 transformiert und zur Pflanze regeneriert.
8. Wirtszelle enthaltend ein Gen erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
9. Wirtszelle enthaltend eine RNA, die durch ein Gen kodiert wird, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 erhältlich ist.
10. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen, enthaltend das Gen erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
11. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen enthaltend die RNA, die durch ein Gen kodiert wird, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 erhältlich ist.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : GR

1. Gen kodierend auf RNA-Ebene für eine Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann und die in Folge verknüpft ist mit einer antisense-Sequenz, die in sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglicht sowie mit einer antisense Sequenz, die in sense Orientierung für ein für den Stoffwechsel einer Pflanze destruktives Protein kodiert.
2. Gen nach Anspruch 1 kodierend für eine Initiationssequenz des 3'-Endes einer Virus (+)RNA oder des 3'-Endes einer Virus (-)RNA.
3. Gen nach Anspruch 1 kodierend für eine interne Initiationsstelle einer Replikase einer Virus (+)RNA oder einer Virus (-)RNA.
4. RNA kodiert durch ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Wirtszelle enthaltend ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Wirtszelle enthaltend eine RNA nach Anspruch 4.
7. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen, enthaltend das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
8. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen enthaltend die RNA nach Anspruch 4.
9. Verwendung der durch das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodierten RNA als Vorstufe zu einem antiviralen Agens.
10. Verwendung der durch das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodierten RNA als antivirales Agens

EP 0 479 180 A2

nach Inkubation mit Replikase.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 479 180 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91116635.3

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/11, C12N 5/10,
A01H 5/00, A61K 31/70,
//C12N15/55, C12N9/22**

(22) Anmeldetag: 30.09.91

(30) Priorität: 05.10.90 DE 4031543

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.04.92 Patentblatt 92/15

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE ES FR GB GR IT LI NL

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 26.08.92 Patentblatt 92/35

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: **Eckes, Peter, Dr.**
Am Flachsland 18
W-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)
Erfinder: **Schneider, Rudolf, Dr.**
Feldbergstrasse 98
W-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)

(54) **Virusresistente Pflanzen, Verfahren zu ihrer Herstellung.**

(57)

Die Erfindung betrifft Gene zur Herstellung virusresistenter Pflanzen

Das Gen kodiert für eine Sequenz, die als Initiationssequenz zur Synthese einer komplementären RNA dienen kann und die in Folge verknüpft ist mit einer antisense-Sequenz, die in sense Orientierung eine cap unabhängige Translation ermöglicht sowie mit einer antisense Sequenz, die in sense Orientierung für ein für den Stoffwechsel einer Pflanze destruktives Protein kodiert.

Nachdem ein Virus die Zelle befallen hat, wird die RNA mittels der viralen Replikase oder durch eine Replikasefunktion, die über einen anderen Mechanismus in der Zelle aktiviert wurde, in eine komplementäre RNA umgeschrieben und die nun in sense Orientierung vorliegende Information für ein zelldestruktives Enzym wird abgelesen.

EP 0 479 180 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 11 6635

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, 8. Oktober 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 127723, JUN, WANG: 'Preparation of transgenic plants for control of virosis' Seite 205 ; * Zusammenfassung * & CN-A-1 033 645 (FAMING ZHUANLI SHENQUING GONKAI SHUOMINGSHU) 5. Juli 1989 -----	1-10	C12N15/11 C12N15/10 A01H5/00 A61K31/70 //C12N15/82 //C12N9/22
P,X	WO-A-9 113 994 (CSIRO) 19. September 1991 * Seite 8, Zeile 1 - Zeile 10 * -----	1-10	
A	EP-A-0 298 918 (CIBA-GEIGY) 11. Januar 1989 * Seite 2, Spalte 2, Zeile 38 - Seite 3, Spalte 3, Zeile 40 * -----	1-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			C12N A01H
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchierter DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 23 JUNI 1992	Prüfer MADDOX A. O.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung alleine betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	